УДК 616-006.81-085.371:616-097

И.Н. Михайлова[1], К.А. Парсункова[2], И.В. Евсегнеева[3], Л.Б. Краснова[2], К.А. Барышников[1], Е.А. Черемушкин[1], С. Субраманиан[1], Л.Ф. Морозова[1], О.С. Бурова[1], А.В. Караулов[1,3], С.Л. Киселев[4], Л.В. Демидов[1], А.Ю. Барышников[1]

ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ХОДЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ АЛЛОГЕННЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

[1]РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва.
[2]ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва
[3]ММА им. И.М. Сеченова, Москва
[4]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва

Контактная информация:
Парсункова Кермен Анатоьевна, и.о. заведующей отделом клинической химии Государственное унитарное предприятие Международный научно-клинический медицинский центр «Интермедбиофизхим»
адрес: 107031, Москва г., ул. Рождественка, д.21; **тел.** +7(495)-623-31-16
e-mail: parsunkova@rambler.ru

Статья поступила 03.09.2009, принята к печати: 05.10.2009.

Резюме

В настоящей статье представлены результаты клинического исследования по вакцинотерапии меланомы с использованием аллогенных клеток, целью которого является изучение динамики цитокинов на фоне вакцинотерапии в терапевтическом режиме (после радикального хирургического вмешательства).

Ключевые слова: вакцина, аллогенные клетки, меланома, опухолевые антигены, иммунная система, цитокины.

I.N. Mikhailova[1], K.A. Parsunkova[2], I.V. Evsegneeva[3], L.B. Krasnova[2], K.A. Baryshnikov[1], E.A. Cheromushkin[1], S. Subramanian[1], L.F. Morozova[1], O.S. Burova[1], A.V. Karaulov[1,3], S.L. Kiselev[4], L.V. Demidov[1], A. Yu. Baryshnikov[1]

THE DYNAMICS OF CYTOKINES EXPRESSION IN PATIENTS WITH DISSEMINATED MELANOMA DURING ALLOGENIC CELL BASED VACCINE TREATMENT

[1]N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow
[2]«Intermedbiophyshem», Moscow
[3]I.M. Sechenov Moscow Medical Academy
[4]N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Moscow

Abstract

We conducted the clinical trial using allogenic cell based vaccine for melanoma treatment. Serum cytokines were evaluated in advanced melanoma patients and in patients after radical surgery.

Key words: vaccine, allogenic cell, melanoma, tumor antigens, immune system, cytokines.

Введение

В работах последних лет более пристально изучаются возможные воздействия на иммунную систему с помощью специфических противоопухолевых вакцин. Перспективным является разработка генно-инженерных противоопухолевых вакцин. Этот метод еще называют генотерапией рака. Генотерапия – это способ лечения, при котором функционирующий ген вводится в соматические клетки больного с целью исправления врожденных генетических нарушений или для придания клеткам новых биологических свойств, обеспечивающих благоприятный терапевтический эффект. Молекулярный носитель одного гена или комплекса генов, служащий для переноса в реципиентные клетки, называется вектором. Вектор может представлять собой просто фрагмент ДНК или РНК, или те же молекулы, включенные в липосомы или вирусный вектор [1].

Эффективность неспецифической противоопухолевой иммунотерапии как одного из методов лечения злокачественного процесса рассматривается уже не только с точки зрения непосредственных цитотоксических эффектов, но и с учетом иммуномодулирующих эффектов адъюванта антигенспецифических противоопухолевых вакцин. Выраженность таких эффектов зависит от многих параметров, характеризующих и сам вакцинный препарат, и клинико-биологические свойства опухоли, и состояние иммунной системы пациента с опухолью. Пока очевидно лишь то, что различные иммунокомпетентные клетки неоднозначно реагируют на одни и те же вакцины, что, вероятно, и определяет иммуномодулирующие эффекты [4]. Меланома считается иммуннозависимой опухолью, поэтому для лечения используются препараты, влияющие на различные звенья специфического противоопухолевого иммунитета [2]. Одним из важных компонентов иммунного ответа является активация врожденной системы защиты организма. Одним из компонентов врожденной системы защиты организма является семейство белков Tag7/PGRP.

Tag7 – это секретируемый белок с хемокинной активностью и способностью вызывать созревание дендритных клеток [3]. Зарубежными исследователями была показана важная роль *tag7* в обеспечении врожденного иммунного ответа у насекомых. Этот ген был использован для генетической модификации клеток. Оказалось, что его экспрессия подавляет рост опухолевых клеток в организме и активирует противоопухолевый иммунный ответ на повторное введение немодифицированных опухолевых клеток. Авторами в экспериментах было показано, что в противоопухолевый ответ вовлечены дендритные и Т-клетки [14].

Результаты I–II фазы клинических испытаний вакцинации пациентов клетками аутологичных или аллогенных опухолей, трансфицированными конструктами, экспрессирующими *tag7*, показали безвредность процедур, улучшение иммунного статуса, а также стабилизацию или частичную регрессию у 40 % пациентов с опухолями IV стадии после лечения всеми доступными методами [14].

Во время вакцинотерапии проводилось изучение динамики уровня цитокинов в сыворотке крови больных.

Цель исследования

Оценить динамику цитокинов Th1 (IL-2, IL-12, IFN-γ) и Th2 (IL-4,IL-10) в сыворотке крови у больных с диссеминированной меланомой кожи на фоне вакцинотерапии аллогенными опухолевыми клетками.

Материалы и методы

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аллогенных опухолевых клеток метастатической линии меланомы человека, трансфицированных *tag7*.

Критерии включения в исследование: морфологическая верификация диагноза, не менее 4 нед. от окончания предшествующей терапии, общее состояние больного по шкале ECOG не более 2, возраст от 18 лет и старше, отсутствие аутоиммунных заболеваний, письменное согласие на участие в исследовании.

В анализ включено 15 пациентов с регионарными и/или отдаленными метастазами (группа 1) и со стандартным лечением в анамнезе (хирургическое вмешательство, химиотерапия, иммунотерапия), на фоне которого отмечено прогрессирование заболевания, в связи с чем, пациенты получали вакцину в терапевтическом режиме.

Группу 2 (контрольная) составили 82 пациента с диагнозом «меланома кожи» без вакцинации на фоне химиотерапии.

Группу 3 (добровольцев, здоровых доноров) составили 13 доноров, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами исследуемых групп.

Вакцина вводилась пациентам внутрикожно в дозе 10,0–50,0 10^6 клеток, в нескольких точках (2–10) в непосредственной близости от регионарных лимфатических коллекторов; интервалы между вакцинациями составляли 2 нед,, курс 6 вакцинаций. Забор крови проводился до и через 12 нед. после вакцинотерапии. Материалом для исследования служила сыворотка крови.

Содержание IFN-γ, IL-2, IL-12 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа («сэндвич»–вариант ИФА) на диагностических наборах фирмы «BenderMedSystems» (Австрия), а IL-4, IL-10 на коммерческих тест-системах ООО «Цитокин» (Россия). Автоматическое считывание и расчет концентраций производился на спектрофотометре Stat Fax (США) при λ 450 нм против референсной λ 620 нм.

Статистический анализ данных проводился при консультации в.н.с. Олимпиевой С.П. (кафедра медицинской кибернетики и информатики РГМУ) с использованием непараметрических критериев, не зависящих от характера распределения – точного метода Фишера и критерия «χ^2», а также традиционно используемого в биомедицинских исследованиях t-критерия Стьюдента для нормально распределенных переменных. Использовались следующие уровни значимости различий: $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$. При проведении статистического анализа данных (проверка нормальности распределений показателей и др.) и формирования графиков использованы статистические пакеты EXCEL 2003 и STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В начале вакцинотерапии исследовалось содержание IL-2 в сыворотке крови: у всех пациентов в исследуемой группе его уровень достоверно превышал значения такового в контрольных группах (табл. 1) и составил 24,38 pg/ml. По окончании вакцинотерапии аллогенными клетками отмечено достоверное повышение уровня IL-2 с 24,38 до 32,51 pg/ml.

До вакцинотерапии у больных в группе получающих аллогенную вакцину сывороточные концентрации IL-12 были несколько выше по сравнению с таковой в двух других группах и составили в среднем 112,25 pg/ml (табл. 2).

После лечения отмечено значительное повышение исследуемого цитокина в крови больных группы аллогенной вакцины с 112,25 до 173,97 pg/ml.

Таким образом, средний уровень IL-12 в крови больных исследуемой группы изначально был высоким и статистически достоверно повысился в 1,5 в процессе вакцинотерапии.

При анализе содержания IFN-γ в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, было ниже по сравнению таковым в контрольной группой здоровых доноров и превышало значения контрольной группы без вакцинации (табл. 3).

В ходе лечения в группе больных с аллогенной вакциной отмечено снижение уровня интерферона с 34,71 до 26,85 pg/ml.

Таким образом, у больных, проходивших вакцинацию аллогенными клетками, трансфицированными *tag7*, уровень IFN-γ был схож с уровнем здоровых доноров, но в процессе вакцинации он снижался.

При анализе содержание IL-4 в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, было значительно выше и составило в среднем 12,05 pg/ml (табл. 4).

В ходе лечения отмечено значительное уменьшение IL-4 с 12,05 до 8,03 pg/ml.

Таким образом, у больных, проходивших вакцинацию аллогенными клетками, трансфицированными *tag7*, уровень IL-4 был значительно выше по сравнению с контрольными группами и статистически достоверно снижался в ходе вакцинотерапии.

При анализе содержание IL-10 в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, отмечено высокое значение интерлейкина-10 по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 5), которое составило в среднем 10,3 pg/ml.

В ходе лечения отмечалось уменьшение содержания IL-10 в группе больных с аллогенной вакциной с 10,3 до 8,54 pg/mL, однако, не имевшее статистически значимого подтверждения.

Таким образом, высокие значения уровней IL-2, IL-12, IL-4, IL-10 по сравнению с контрольными группами и напротив низкое содержание IFN-γ по сравнению с группой здоровых доноров до лечения у больных, получающих аллогенную вакцину, свидетельствует о существующем у них дисбалансе клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

Таблица 1

Распределение IL-2 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	24,38 14,34	32,51 21,1*
2. Контрольная	16,37 13,14	16,37 13,14
3. Доноры	1,13 0,39	1,13 0,39
Достоверность различий	p 0,001 1–2; 2–3	p 0,001 1–3; 2–3
	p 0,05 1–2	–
*p 0,05 в динамике вакцинотерапии		

Таблица 2

Распределение IL-12 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	112,25 36,23	173,97 95,41*
2. Контрольная группа	96,13 45,41	96,13 45,41
3. Доноры	100,63 35,34	100,63 35,34
*p 0,05 в динамике вакцинотерапии		

Таблица 3

Распределение IFN-γ в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	34,71 19,57	26,85 11,69
2. Контрольная группа	14,84 10,69	14,84 10,69
3. Доноры	39,12 19,7	39,12 19,7
Достоверность различий	p 0,001 1–2; 2–3	

Таблица 4

Распределение IL-4 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	12,05 9,45	8,03 4,32*
2. Контрольная группа	5,6 5,13	5,6 5,13
3. Доноры	1,93 1,22	1,93 1,22
Достоверность различий	p 0,05	1–3
	p 0,01	1–2
	p 0,001	1–3
*p 0,05 в динамике вакцинотерапии		

Таблица 5

Распределение IL-10 в процессе вакцинотерапии аллогенной вакциной

Группы	Среднее содержание, pg/ml	
	До лечения	Во время лечения
1. Аллогенная вакцина	10,3 10,3	8,54 5,6
2. Контрольная группа	8,28 8,11	8,28 8,11
3. Доноры	4,89 1,78	4,89 1,78

Рядом авторов в исследованиях сыворотки крови пациентов с диссеминированной меланомой также подтверждается дисбаланс Th1/Th2 и низкое содержание уровня INF-гамма [9; 11; 17; 18; 20].

Имеющиеся в литературе данные по определению сывороточных уровней цитокинов у больных с меланомами кожи немногочисленны и весьма противоречивы.

Например, группа исследователей во главе с Z.R. Yurkovetsky по результатам мультифакторного анализа выявили изначально высокие значения IL-12, которые в ходе иммунотерапии снижались.

Результаты же группы L. Lauerova свидетельствуют о низком содержании IL-12 до лечения и дальнейшем его снижении, а по данным M.M. Barrio et al. медиана сывороточного IL-12 была ниже у прогрессирующих пациентов (61,6 pg/ml), по сравнению с пациентами без признаков заболевания (89 pg/ml) [5; 11; 20].

В то же время наше клиническое исследование показало, что на фоне вакцинотерапии аллогенными клетками происходит достоверное увеличение уровней IL-2, IL-12.

Уровни IL-4, IFN-γ у пациентов группы аллогенной вакцины в результате наших исследований снижались.

Однако, по данным Hui Li et al. при изучении влияния аллогенной вакцины обнаружено существенное повышение уровня Th1-типа цитокина (IFN-γ) после вакцинации, но при этом статистически значимого различия в уровнях Th2-типа цитокинов (IL-4) в ходе лечения не было обнаружено [10].

Концентрации IL-10 у пациентов на фоне терапии генно-инженерной вакциной, представленной опухолевыми клетками, трансфицированными *tag7* снижались. На сегодняшний день участие IL-10 в противоопухолевом иммунном ответе является спорным [8; 15]. Существует предположение о двойственной роли IL-10 в опухолевом микроокружении. Конституционно секретируясь опухолями, IL-10 играет две основных роли: усиление NK-клеточный киллинга опухолей, и, возможно, поглощение измененных опухолевых клеток АПК, а также ингибирование созревания АПК с последующим поддержанием способности поглощать антигены. Таким образом, IL-10 поддерживает хронический статус воспаления в опухолевом микроокружении и ингибирует восстановление и активацию адаптивного иммунитета [13].

Причиной повышения циркулирующего уровня IL-10 у больных с диссеминированной меланомой может быть его продукция клетками метастатической меланомы или опухолеассоциированными лимфоцитами [6; 12] и по данным W. Dummer и J. Nemunaitis et al. повышение уровня IL-10 как потенциального иммуносупрессивного цитокина ассоциируется с распространенной III-IV стадией меланомы [7; 16].

В то же время последние исследования продемонстрировали, что IL-10 продуцируемый $CD4^+$ Т-клетками способен проявлять сильный противоопухолевый эффект [19].

Выводы

1. В ходе нашего оригинального исследования подтверждено нарушение продукции различных цитокинов у больных, страдающих диссеминированной меланомой.
2. Высокие уровни сывороточных IL-2, IL-12, IL-4 и IL-10 и низкое содержание IFN-γ свидетельствуют о существующем выраженным дисбалансе соотношения Th1/Th2 у больных, страдающих диссеминированной меланомой.
3. Повышение уровней сывороточных IL-2, IL-12 и снижение IL-4 и IL-10 у пациентов на фоне терапии генно-инженерной вакциной, представленной собственными опухолевыми клетками, трансфицированными *tag-7,* свидетельствуют о выраженной активации Th1–типа иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Москвы в рамках научно-технической программы «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний».

Литература

1. *Барышников А.Ю.* Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы // Маммология. – 2007. – № 1. – С. 13–6.
2. *Барышников К.А., Михайлова И.Н., Бурова О.С. и др*. Оценка иммунного статуса при терапии геномодифицированной вакциной//Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 4.
3. *Киселев С.Л.* Современная генная терапия: что это такое и каковы ее перспективы?//Пр. онк. – 2003. – Т. 4 (3) – С. 167.
4. *Моисеенко В.М., Балдуева И.А.* Иммунологические аспекты опухолевого роста и возможности вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 5.
5. *Barrio M.M., de Motta P.T., Kaplan J. et al.* A phase I study of an allogenic vaccine (VACCIMEL) with GM-CSF in melanoma patients // Journal of Immunotherapy. – 2006. – Vol. 29(4). – P. 444–54.
6. *Brady M.S., Eckels D.D., Lee J.S.* Cytokine production by CD4+ T-cells responding to antigen presentation by melanoma cells // Melanoma Res. – 1999. –Vol. 9. – P. 173–80.
7. *Dummer W., Becker J.C., Schwaaf A. et al.* Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma // Melanoma Res. – 1995. – Vol. 5. – P. 67–8.
8. *Euw von E.M., Barrio M.M., Furman D. et al.* A phase I clinical study of vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with allogeneic apoptic/necrotic melanoma cells… // J Trans Med. – 2008. – Vol. 6. – P. 6.
9. *Hersey P., Menzies S.W., Halliday G.M. et al.* Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma // Cancer Immunol Immunother. – 2004. – Vol. 53(2). – P. 125–34.
10. *Hui Li, Hong-Jing Jiang, Ming-Quan Ma et al.* Vaccination with Allogenic GM-CSF Gene-Modified Lung Cancer Cells: Antitumor Activity Comparing with that Induced by Autologous Vaccine // Cancer Biotherapy@ Radiopharmaceuticals. – 2007. – Vol. 22(6). – P. 790–8.
11. *Lauerova L., Dusek L., Simickova M. et al.* Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response // Neoplasma. – 2002. – Vol. 49(3). – P. 159–66.
12. *Lazar-Molnar E., Hegyesi H., Toth S., Falus A.* Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma // Cytokines. – 2000. – Vol. 12(6). – P. 547–54.
13. *Mocellin S., Panelli M.C., Wang E. et al.* The dual role of IL-10 // Trends Immunol. – 2003. – Vol. 24**.** – P. 36–43.
14. *Moiseyenko V.M., Danilov A.O. et al.* Phase I/II trial of gene therapy with autologous tumor cells modified with tag7/PGRP-S gene in patients with disseminated solid tumors: miscellaneous tumors//Ann Oncol. – 2005. – Vol. 16(1). – P. 162–8.
15. *Moore K.W., Malefyt R.W., Coffman R.L., O'Garra A.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptorn// Annu Rev Immunol. – 2001. – Vol. 19. – P. 683–765.
16. *Nemunaitis J., Fohg T., Snabe P. et al.* Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma // Cancer Ivest. – 2001. – Vol. 19(3). – P. 239–47.
17. *Porter G.A., Abdalla J., Lu M. et al.* Significance of Plasma Cytjkine levels in melanoma patients with histologically negative sentinel lymph nodes // Ann Surg Oncol. – 2001. – Vol. 8(2). – P. 116–22.
18. *Schiltz P.M., Dillman R.O.* Serum cytokines in metastatic melanoma patients treated with an autologous tumor vaccine // Cancer Biother Radiopharm. – 2003. – Vol. 18(6). – P. 879–86.
19. *Segal B.M., Glass D.D., Shevach E.M.* Cutting edge: IL-10-producing $CD4^+$ T cells mediate tumor rejection // J. Immunol. – 2002. – Vol. 168. – P. 1–4.
20. *Yurkovetsky Z.R., Kirkwood J.M., Edington H.D. et al.* Multiplex Analysis of Serum Cytokines in Melanoma Patients Treated with Interferon-α2b // Clin Cancer Res. – 2007. – Vol. 13(8). – P. 2423–8.